

## 枯草菌代謝制御ネットワークの物質産生系への有効活用

●藤田 泰太郎<sup>1)</sup> ◆西岡 孝明<sup>2)</sup> ◆広岡 和丈<sup>1)</sup>

1) 福山大学生命工学部 2) 京都大学大学院農学研究科

### <研究の目的と進め方>

土壌細菌である枯草菌は、菌体外酵素や抗生物質の産生、イノシン酸等の呈味性成分の発酵生産等に、産業界で頻用される有用な微生物である。また、枯草菌はグラム陰性の大腸菌と並んで、その分子遺伝学研究が進展し、特にその孢子形成の研究は細胞分化の系で最も分子レベルで解明されたものとなっている。このように有用微生物でありかつ分子遺伝学研究の進んだ枯草菌が、我国のゲノム研究のモデル生物の一つとして取り上げられ、微生物のゲノム研究を先導し幾多の研究成果を挙げてきた。

本研究は、枯草菌の転写制御ネットワーク研究で明らかになった代謝制御ネットワーク情報を活用して、枯草菌の物質産生系への有効活用を図らんとするものである。主たる研究対象とする転写制御蛋白質は個々の物質合成系のフィードバック制御に関与するものとグローバルに代謝制御に関与するものである。後者の転写制御蛋白質としてまず挙げられるのは炭素代謝を統括する CcpA であり、抗生物質生産や分泌酵素生産を低下させるカタボライト抑制に関与している。その他のグローバルな転写制御因子は、GTP と分岐鎖アミノ酸の濃度で制御される CodY 蛋白質と緊縮制御を担う RelA 蛋白質であり、物質合成系の制御に深く関わっている。これらのグローバルな制御蛋白質を改変し物質生産能の向上を図るが、その改変に伴う細胞機能の障害をいかに解決するかが問題になり、そのためにもこれまで蓄積してきた転写制御ネットワークの知見が必要となる。また、これらの転写制御蛋白質が作動する状態なのか、あるいは物質産生のボトルネックとなっている代謝産物は何か等のメタボローム情報も、有用物質の効率よい産生のための代謝制御ネットワークの改変に必須となる。これらの改変により、アミノ酸やヌクレオチド等の有用物質の産生の効率化をはかり、枯草菌によるものづくりの発展に寄与する。

### <2007 年度の研究の当初計画>

枯草菌の代謝制御ネットワークのカタボライト制御の全貌を図 1 に示す。有用物質の効率よい発酵生産には、このカタボライト制御を念頭に、グルコース等の糖質の炭素を如何に効率よく有用物質合成に向かわせるかである。DNA マイクロアレイとメタボローム解析の結果、グルコースを炭素源として分岐鎖アミノ酸とくにイソロイシンを効率よく生産させるにはリジン飢餓条件が有効であるが、リジン飢餓に伴い緊縮制御がかかりグルコースの取り込み系 (*ptsG*) やピルビン酸脱水素酵素遺伝子 (*pdh*) オペロンの発現低下を引き起こし、逆に分岐鎖アミノ酸合成に関与する *ilv-leu* オペロンやピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (*pycA*) の転写が増加する事が明らかになった。そこで次の研究計画をたて、炭素源のイソロイシン等の有用物質への効率よい変換方策の確立を目指す。

1. 枯草菌の *ilv-leu* オペロン緊縮制御は、生体内の GTP 濃度の低下によって起こり、少なくとも転写開始点近傍の塩基配列

写開始点およびが重要である事が判明した。この知見に基づき、転写開始点近傍の塩基置換の *ilv-leu* の発現に及ぼす影響を探求する。

強い負の緊縮制御を受けるグルコースの取り込みに関与する、*ptsGHI* オペロンの緊縮制御が作動しないように、転写開始点近傍の塩基を改変を試みる。また、負の緊縮制御を受ける *pdh* オペロンの転写解析を行い、その転写開始点を決定し、その近傍の配列を *ptsG* のそれと比較する。さらに、正の緊縮制御を示す *pycA* 遺伝子の転写解析を行い、転写開始点の配列を決定し、その近傍の配列を *ilv-leu* のそれと比較する。

2. イソロイシンの前駆体であるスレオニン合成に関わる *hom-thrC-thrB* オペロンがリジン欠乏そのもので誘導される事が判明した。この誘導が正の緊縮制御によるものであるかあるいはリジンによる転写抑制の解除かを分子レベルで明らかにする。この知見に基づき、*hom-thrC-thrB* を構成的に発現する変異株を作成し、イソロイシン発酵を増強できるか検討する。

### <2007 年度の成果>

1. 分岐鎖アミノ酸合成に関わる *ilv-leu* オペロンのアミノ酸飢餓による正の制御は、GTP 低下による CodY による負の制御の解除とこのオペロンの転写開始点近傍に存在する *cis*-配列を介した正の制御である事を明らかにした。後者の制御の *cis*-配列を特定するため、転写の開始点近傍 (-2)TTCA(+2) に塩基置換を導入し、正の緊縮制御への影響を見たところ、(+1)への G の置換がやや、(+2)の G への置換が大きく影響し、とくに後者の置換は負の制御にまで転換した。*ilv-leu* オペロンの *in vitro* の転写系を組み、RNA ポリメラーゼの基質である GTP と ATP の量を変動させ run-off 転写産物の量を測定したところ、(+2)の G への置換が GTP の濃度の低下に極めて感受性が高くなる事が判った。即ち、細胞のエネルギー状態の指標である GTP の量が緊縮制御を受けるオペロンの転写に強く影響する事が判明した。尚、4 種の転写開始点近傍の塩基置換 (-2)TTCA、TTGA、TTGC および TTGG(+2) をもつ *ilv-leu* プロモーターの転写開始点を決定したところ、野生型の TTCA は +1 であるがその他は +1 あるいは +2 であった。

*ptsG* の転写開始点の塩基配列は、(-2)TTGG(+2) であり、最初の G が転写開始点で、その次の G を A に変えたときこの負の緊縮制御が見られなくなった。この知見は (+2)の G が負の緊縮制御に関与することを示し、*ptsG* の負の緊縮制御を回避する方策が見つかった事を意味する。さらに負の制御を受ける *pdh* オペロンと正の制御を受ける *pycA* 遺伝子の転写の開始点は、それぞれ、(-2)ATGT(+2) と (-2)TTAT(+2) であり、(+1)の G と A が負と正の制御関連していることが強く示唆された。これらの知見は転写開始点あるいはその次の塩基が G か A で、緊縮制御が正の制御か負の制御かが決定される事が推察された。従って、緊縮制御をうけるプロモータでは、RNA ポリメラー

ぜによる転写開始の頻度が、基質のGTPとATP特にGTPの濃度に強く依存すると推定された。

2. 野生株と *codY* 変異株を用いたメタボローム解析により、*codY* 変異が分岐鎖アミノ酸合成を上昇させるという事がわかった。また、リジン欠乏で緊縮制御をかけた場合も分岐鎖アミノ酸合成が高まった。しかし、イソロイシンの前駆体であるスレオニン合成に関わる *hom-thrC-thrB* オペロンは、正の緊縮制御を受けるのではなく、リジン欠乏そのもので誘導される事が判明した。このリジンによる抑制に与るリプレッサーの同定を試みたが、成功していない。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は、枯草菌には生体内のエネルギー状態の指標であるGTPの濃度に依存した転写のプロモーターの活性の制御という、新規でグローバルな代謝制御系が存在することを示し、原核生物の転写制御系の研究に新たな1ページを加える事になる。また応用研究として、この分子レベルで解明する制御系を含めた、代謝制御に関わる転写制御蛋白質のネットワーク情報を基に、有用物質生産の効率化を目指すというも国際的に新規な試みである。本研究で獲得できる成果は、原核生物の代謝制御系研究に大きく貢献するのみならず、今後の微生物利用、とりわけ枯草菌、乳酸菌を代表とするグラム陽性の低GC含量の有用細菌の利用に関してブレイクスルー的な汎用新技術を提供するものとなる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究は、当初、アミノ酸やヌクレオチド発酵、菌体外酵素や抗生物質の産生等広範な有用物質を産生の効率化を目指したが、これらの産生系の総てが炭素フローの有用物質への効率的変換で達成されるものである。従って、本研究は応用研究としてイソロイシン合成の効率化にのみ特化しているが、この研究による成果は、枯草菌による物質生産の効率化に汎用性の高い手法を提供する。本研究では、発酵工業レベルでの生産性の向上は望めそうもないが、汎用性の高い遺伝子・ゲノムの改変法の提示は、現在使用されている応用菌株のさらなる効率化に繋がるものと考え。

2007年度の研究では、転写開始点近傍の塩基配列に依存する緊縮制御の存在を明らかにしたがリジン抑制を受ける *hom-thrC-thrB* オペロンのリプレッサーの同定には至らなかった。

<今後の課題>

代謝ネットワークの構成する基軸代謝制御の一つとみなされる、細胞内のエネルギー状態の指標であるGTPの濃度を感知し、転写のプロモーターを活性化あるいは阻害をする、本研究で明らかになった極めてグローバルな代謝制御の分子認識機作を解明する。さらに、グルコース等の炭素源からの脂肪酸合成やTCAサイクルに向かうアセチル-CoAの合成を必要最小限に抑えることにより炭素を炭酸ガスとして無駄に放出させず、炭素源を効率的に有用物質へ変換する方策を探索する。

<成果公表リスト>

- 1) 論文
  - 1. 0704191900  
Matsuoka, H., Hirooka, K., and Fujita, Y.: Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation, *J. Biol. Chem.*, 282(8), 5180-5194 (2007)
  - 2. 0801181214  
Hirooka, K., Kunikane, S., Matsuoka, H., Yoshida, K., Kumamoto, K., Tojo, S., and Fujita, Y.: Dual regulation of the *Bacillus subtilis* regulon comprising the *lmrAB* and *ysaGH* operons and *ysaF* gene by two transcriptional repressors, *LmrA* and *YsaF*, in response to flavonoids, *J. Bacteriol.*, 189(14), 5170-5182 (2007)
  - 3. 0801181453  
Fujita, Y., Matsuoka, H., and Hirooka, K.: Regulation of fatty acid metabolism in bacteria, *Mol. Microbiol.*, 66(4), 829-839
- 2) 著書
  - 1. 0801181538  
Fujita, Y., Miwa, Y., Tojo, S., and Hirooka, K.: Carbon catabolite control and metabolic networks mediated by the *CepA* protein in *Bacillus subtilis*, *Global regulatory networks in Bacillus subtilis 2007*, Fujita, Y. (Ed.), pp.91-110, Transworld Research Network, Kerala, India, 2007

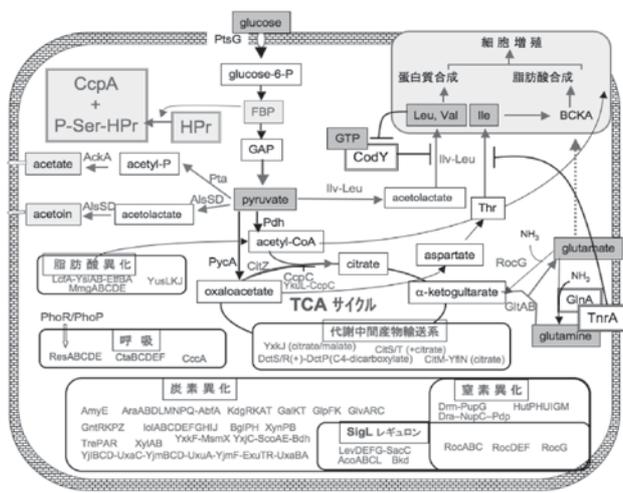


図1. 枯草菌の代謝制御ネットワークのカタボライト制御。CcpA蛋白質は炭素代謝系の制御に中心的役割を担う。培地中にグルコースが存在するとフルクトース二リン酸 (FBP)が増加し、P-Ser-HPrの生成を促す。CcpAは、P-Ser-HPrと複合体を形成して炭素代謝オペロンのシス配列に結合して転写を制御する。この複合体により活性化されるのは、酢酸やアセチンの菌体外分泌系および分岐鎖アミノ酸合成系とグルタミン酸供給系であり、その他の代謝経路はすべて抑えられる。